

3
24

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PERSPECTIVAS EN EL DESARROLLO DE UNA VACUNA CONTRA LA
INFECCIÓN POR ROTAVIRUS : CARACTERIZACIÓN DE LA
GLICOPROTEÍNA DE CAPA EXTERNA DEL ROTAVIRUS DE SIMIO
S11 EXPRESADA EN ESCHERICHIA COLI

Tesis que para obtener el grado de Licenciada en
Investigación Biomédica Básica

presenta

MAGDALENA PLEBANSKI LAZAROWICZ

MEXICO

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
OBJETIVO.....	8
MATERIALES Y METODOS.....	9
RESULTADOS.....	14
DISCUSION.....	34
BIBLIOGRAFIA.....	39

INTRODUCCION

GENERALIDADES

Por su alta morbilidad y mortalidad en infantes las enfermedades diarréicas siguen siendo un importante problema de salud a nivel mundial (1,2). El problema se acrecenta en los países en vías de desarrollo donde, por las condiciones de vivienda, alimentación, educación y saneamiento ambiental, resulta casi imposible el control de los agentes infecciosos causantes de diarrea (3,4).

Entre los agentes etiológicos más importantes de la gastroenteritis infantil tenemos a la *Escherichia coli* enteropatogénica y la enterotoxigénica; algunas especies de *Campilobacter*, *Salmonella* y *Shigella*; y algunos virus como los rotavirus, adenovirus, pararotavirus y los virus redondos pequeños (5). De entre los agentes de tipo viral los rotavirus son los más comunes (6).

Los rotavirus infectan a las células epiteliales de las puntas de las vellosidades del intestino delgado, causando su desprendimiento e interrumpiendo las funciones normales de absorción (19). Lo anterior se manifiesta clínicamente con una diarrea deshidratante, vómito, fiebre y deterioro del estado nutricional (6).

En México, los rotavirus son responsables de aproximadamente el 25% de los casos de hospitalización por diarrea en niños entre los seis meses y los tres años de edad (7). La mayor frecuencia de afección ocurre en los meses de otoño (8).

Los rotavirus infectan también a diversas especies de otros mamíferos además del ser humano, así como a una gran variedad de aves (9). En algunos animales de crianza, notablemente el cerdo, las infecciones por rotavirus traen grandes pérdidas económicas, no tan solo por la mortalidad sino también por el retardo en el crecimiento que acarrearán.

Por todo lo anterior se hace evidente la necesidad del desarrollo de medidas preventivas y terapéuticas. Entre éstas están el control de la higiene, la construcción de hospitales, la distribución de sueros orales que permita la rehidratación de los infantes y, desde luego, el desarrollo de vacunas. En cuanto a la infección de animales, resulta poco práctico pensar en el control de la higiene o en una constante supervisión veterinaria, sin embargo, sigue vigente la posibilidad de una vacunación efectiva.

La obtención de potenciales vacunas ha sido enfocada por métodos convencionales, habiéndose probado en animales (10,11) y recientemente en humanos (12,54,55,71), la capacidad protectora de cepas atenuadas así como de virus heterólogos, con resultados dudosos.

La producción de inmunógenos potenciales ha sido abordada también a través de métodos modernos que hacen uso de la metodología del DNA recombinante los cuales, aunque menos probados hasta ahora, permitirían la elaboración de vacunas más seguras a un menor costo y en forma más rápida. Esta última ventaja podría ser importante para responder prontamente ante la aparición de cepas epidémicas.

ESTRUCTURA

Al microscopio electrónico los rotavirus se observan como partículas icosaédricas, con un diámetro que oscila entre los 65 y 75 nm. Están constituidos por una doble cápside proteica que envuelve a un genoma compuesto de 11 segmentos de RNA de doble cadena (14). Cada uno de los 11 segmentos codifica por una proteína específica (15). Debido a estas características estructurales se ha clasificado a los rotavirus como un nuevo género dentro de la familia Reoviridae (19).

La cápside interna de los rotavirus esta constituida por tres proteínas: VP1, VP2 y VP6, mientras que la cápside externa la integran las proteínas VP3 y VP7 (19). Inicialmente se había propuesto la existencia de otras dos proteínas en la capa externa: VP5 y VP8, sin embargo, se ha logrado demostrar que éstas son tan solo producto de la hidrólisis con tripsina de la proteína VP3. Aunque el mecanismo molecular todavía se desconoce, ésta proteólisis se ve asociada con un aumento en la infectividad de los rotavirus (16).

Los rotavirus del grupo A analizados hasta la fecha comparten un antígeno de grupo. Este y el antígeno de subgrupo se localizan en la proteína VP6 de la cápside interna (17).

CARACTERISTICAS DE LAS PROTEINAS DE CAPA EXTERNA

Los antígenos específicos de serotipo, determinados por ensayos de neutralización, se encuentran en la cápside externa, tanto en VP3 como en VP7 (18,53).

La posibilidad de contar con rotavirus modelo tales como el rotavirus de simio SA11, los rotavirus de ternera NCDV y UK, y los rotavirus aislados de humano Wa, DS1, P, ST3, los cuales han sido adaptados a crecer en cultivo de células, ha permitido el estudio detallado de estos virus, empezandose a vislumbrar funciones de algunas proteínas virales (9,17,19).

A la proteína de capa externa VP3 se le ha identificado como la hemaglutinina viral, y se le ha asignado un papel importante en el proceso de internalización del virus a la célula huésped. Este proceso está asociado con el corte proteolítico que genera a las proteínas VP5 y VP8 (21,22). VP3 es también capaz de inducir anticuerpos que neutralizan la infectividad viral. Así, se ha descrito que anticuerpos monoclonales contra esta proteína son capaces tanto de neutralizar al virus *in vitro* (32,68), como de proteger pasivamente contra la diarrea a ratones lactantes (35).

La otra proteína de capa externa de los rotavirus, VP7, está glicosilada con residuos de alta mannososa, y diversas evidencias sugieren que es a través de esta glicoproteína que el virus interacciona con su receptor en la superficie de la célula huésped (19,23,27). VP7, al igual que VP3, es capaz de inducir anticuerpos neutralizantes cuando se encuentra formando parte de las partículas virales (18). VP7 mantiene su capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes, aunque disminuida, cuando se utiliza como proteína aislada (74), e incluso cuando se utilizan algunos fragmentos de ella (36). Anticuerpos monoclonales dirigidos contra VP7 también son capaces de neutralizar la infectividad viral *in vitro* (32,33,34), y de proteger pasivamente a ratones contra la diarrea causada por rotavirus (35).

Las proteínas de capa interna de los rotavirus no parecen jugar un papel importante en la inducción de protección contra la infección, por lo cual la mayor parte de los estudios enfocados al desarrollo de medidas preventivas se ha canalizado a la caracterización de las dos proteínas de capa externa VP7 y VP3, así como de los genes que las codifican (9,13,17,19,20).

El gene 4 de SA11 tiene 2362 nucleótidos (nt), de largo y contiene un marco abierto de lectura de 2328 nt, el cual codifica por VP3, una proteína de 776 aminoácidos (aa), con un peso molecular de 86 733 daltones (d). El marco abierto de lectura empieza en el nucleótido 10 y termina en el 2337, dejando secuencias no traducidas en los extremos 5' y 3' de 9 y 25 nucleótidos, respectivamente. Los dos sitios de corte con tripsina de VP3, los cuales se han asociado al aumento de la infectividad de los rotavirus, están en los aminoácidos 241 y 246. Tomando como referencia el primer sitio de corte, los dos productos de rompimiento con tripsina, VP5 y VP8 son de 535 (59,

964 d), y 241(26,787 d), aminoácidos, respectivamente. La comparación de la secuencia de aminoácidos en la región de corte con tripsina entre proteínas equivalentes de varios rotavirus de origen humano y animal muestra que los dos aminoácidos básicos en las posiciones 241 y 246 se encuentran absolutamente conservados, apoyando la importancia que el procesamiento de esta región pueda tener en el proceso de penetración del virus a la célula huésped (16,26).

El gene 9, el cual codifica por VP7 en el rotavirus SA11, tiene 1062 nt de largo y una secuencia abierta de lectura de 978 nt, la cual codifica por una VP7 de 326 aa y 37,000 d de peso molecular. Las regiones no traducidas en los extremos 5' y 3' son de 48 y 36 nt, respectivamente (25). El análisis de hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos deducida para VP7 a partir de la secuencia de cDNA (65), ha mostrado dos regiones altamente hidrofóbicas en el extremo amino terminal de la proteína. Estas dos regiones probablemente corresponden al péptido líder y a la zona de anclaje de VP7 a membranas celulares (66,70). El análisis de la secuencia de aminoácidos de VP7 muestra solo un sitio potencial para unión de carbohidratos, el cual se encuentra la asparragina en posición 69.

La utilización de anticuerpos monoclonales en ensayos de neutralización *in vitro* (27,28,32,33,34), o de protección *in vivo* (35), ha demostrado inequívocamente la presencia de epítopos de neutralización de la infectividad viral en las proteínas VP3 (32,68) y VP7 (27,28,33,34). Dyal-Smith y colaboradores (49), secuenciaron virus mutantes que habían sido seleccionados por su resistencia a la neutralización con anticuerpos monoclonales neutralizantes. Esto les permitió establecer la presencia de tres epítopos neutralizantes distintos dentro de la glicoproteína VP7. De estos epítopos, denominados A, B y C (aminoácidos 87 al 96, 145-150 y 211-223 de la secuencia para la VP7 de SA11, respectivamente), el epítipo C parece ser el de mayor relevancia, ya que mutaciones en éste provocan una pérdida de hasta 10 veces del potencial neutralizador de un suero antiviral policlonal. El uso de monoclonales ha permitido también afirmar el papel de la VP3 como posible responsable de las neutralizaciones heterotípicas (68).

En el laboratorio se ha trabajado paralelamente con las proteínas VP3 y VP7 en búsqueda de inmunógenos para establecer una adecuada protección contra la infección por rotavirus. Se han explorado dos avenidas metodológicas principalmente: la síntesis química de péptidos de regiones relevantes de estas proteínas y la expresión de éstas en vehículos procariotes.

SINTESIS DE LA VP7 DE SA11 EN BACTERIA

Los genes 4 y 9 del rotavirus de simio SA11, los cuales habiendo sido previamente clonados y secuenciados en nuestro laboratorio, se utilizaron para obtener la síntesis de regiones seleccionadas de las proteínas VP3 y VP7 en bacteria (25,26). La construcción del vector de expresión para la VP7 de SA11 en *E. coli* se esquematiza en la Figura 1.

A partir del vector pUMA 932, la VP7 se sintetiza como un producto de fusión con la β -galactosidasa bacteriana, lo que aumenta su estabilidad en éste microorganismo, además de permitir una pronta selección de clones recombinantes y facilitar el proceso de purificación (30).

Se ha reportado que la región hidrofóbica en el extremo N-terminal de las glicoproteínas eucariotas, la cual funciona como péptido señal para transporte a través de retículo endoplásmico, puede ser letal en *E. coli* (32). Debido a esto, se decidió eliminar en la construcción del vector para la expresión de la VP7 a la región del gene que codifica por los 67 aminoácidos de la región amino terminal del producto primario de traducción de la glicoproteína, los cuales como se menciona anteriormente forman parte de los dos regiones altamente hidrofóbicas. Sin embargo, ya se ha descrito que en el procesamiento intracelular normal de la VP7, se libera un polipéptido de 1500 daltones del extremo amino, por lo que probablemente solo se hayan quitado 15 aminoácidos de la secuencia N terminal de la proteína madura (29). En su vez, en el extremo carboxilo terminal se quitó la región del gene que codifica para los últimos 26 aminoácidos, para así fusionarlo con la enzima bacteriana (31).

El producto híbrido esperado contiene los tres epitopes de neutralización de mayor importancia descritos hasta ahora para VP7 (33) y que comprenden las regiones de los aminoácidos 87 al 96, 145 al 150 y 211 al 222.

Cuando se analizan en geles de poliacrilamida las proteínas sintetizadas por las células de *E. coli* que contienen el pUMA 932 además del producto esperado de 135 kD, aparece otro de menor peso molecular (115 kD), el cual probablemente corresponde al inicio de traducción en un codón interno en la secuencia codificadora para VP7. Este producto empieza probablemente en la metionina 285 de la secuencia de VP7 y acaba en el codón de terminación de *E. coli* (Fig. 2). Cada uno de éstos dos polipéptidos se sintetizan en orgánulos que representan aproximadamente entre el 7 - 20% de la partícula total de la bacteria (31), y pueden ser enriquecidos aprovechando sus propiedades físicas (peso molecular, solubilidad) o biológicas (reconocimiento a sustratos de la β -gal, reconocimiento por anticuerpos).

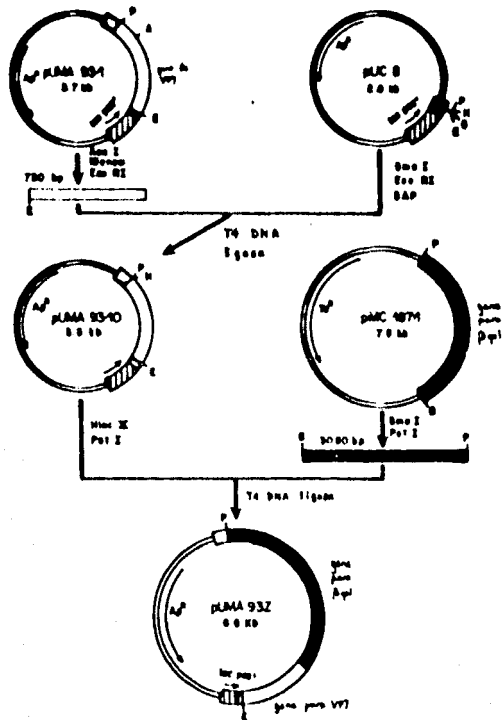


Fig.1. Representación esquemática de los pasos involucrados en la construcción de los plásmidos de expresión para el gene VP7 del rotavirus de simio S111. Abreviaciones: B-gal, B-galactosidasa; lac^{poz}, fragmento truncado del segmento *lacOP2*; enzimas de restricción: P, Pst I; A, Acc I; E, Eco RI; H, Hind III; S, Sma I. Regiones punteadas, secuencias del gene *lac* P en el vector pUC8; regiones rayadas, región reguladora del operón *lac*; regiones blancas, secuencias del gene VP7; regiones sombreadas, secuencias del gene B-gal en el vector pUC187M; doble línea, secuencias de PBR322 en el vector pUC8.

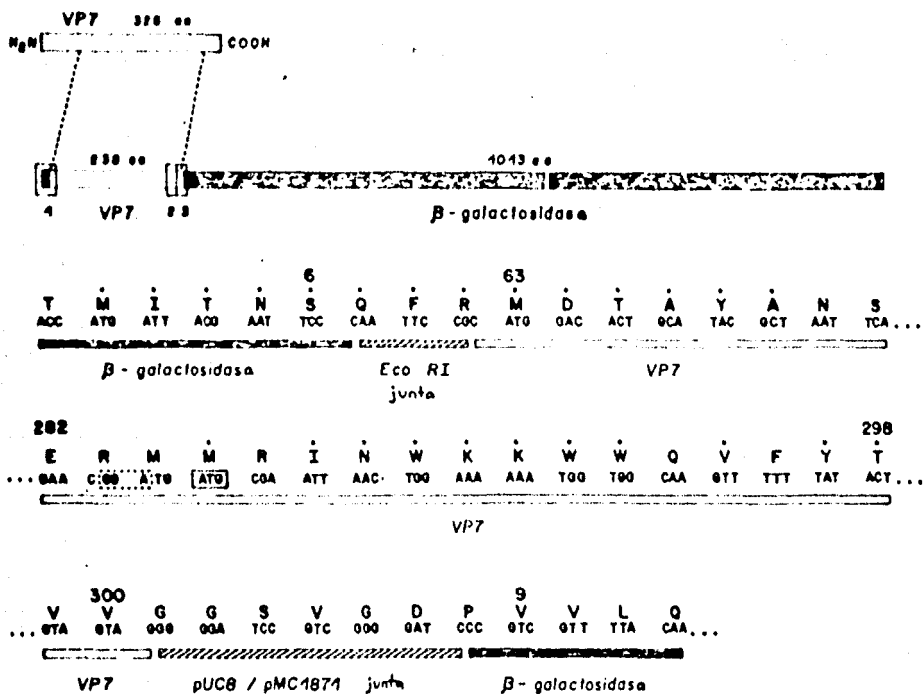


Fig.2. La proteína híbrida VP7-βgal y sus secuencias de unión. (A) Representación gráfica del producto de fusión esperado entre la VP7 de SA11 y la βgal de *E. coli*. La barra blanca superior representa a la proteína VP7 como producto primario de traducción. (B) Secuencia de aminoácidos (y la secuencia nucleotídica codificadora) de las tres regiones de la proteína encuadradas en el inciso (A). Los números encima de los aminoácidos representan la posición de ese aminoácido en la proteína original. Los aminoácidos marcados con un punto fueron determinados por secuenciación directa de los polipéptidos purificados por cromatografía de afinidad. El triplete ATG encuadrado muestra el posible sitio interno de iniciación de la traducción del mensajero híbrido. Los nucleótidos encuadrados con una línea punteada delimitan un posible sitio de unión a ribosomas de este mensajero.

OBJETIVO

El objetivo general de este trabajo es el caracterizar la presencia de sitios funcionales de la glicoproteína de capa externa VP7 del rotavirus de simio SA11 en el polipéptido híbrido VP7-B-galactosidasa sintetizado en *Escherichia coli* y evaluar la potencialidad de este producto como inductor de protección contra la diarrea causada por rotavirus.

Los sitios funcionales que se pretenden analizar son los epitopes de neutralización y aquellos involucrados en la adsorción del virus a la célula huésped.

Para lograr lo anterior es necesario cumplir con los siguientes objetivos específicos:

- a) Establecer un método de enriquecimiento para la proteína de fusión.
- b) Obtener la proteína híbrida en estado soluble.
- c) Montar un ensayo que permita el análisis de la competencia del rotavirus de simio SA11 con la proteína híbrida por los receptores para el virus en células MA104.
- d) Determinar la capacidad de la proteína VP7-B-galactosidasa para inducir anticuerpos neutralizantes para SA11.
- e) Establecer la capacidad de la proteína híbrida para sensibilizar la respuesta inmune.
- f) Determinar la especificidad de serotipo de los anticuerpos neutralizantes inducidos por la proteína de fusión.

MATERIALES Y METODOS

VIRUS: El rotavirus de simio SA11 fue obtenido originalmente del Dr. H.H. Malherbe de la Universidad de Texas. Los rotavirus aislados de humano, Wa y ST3, fueron donados por el Dr. Y. Hoshino del N.I.H. (Washington). Los virus se crecieron en células epiteliales de riñón de mono, MA104, y fueron purificados de acuerdo al protocolo descrito anteriormente (16). Brevemente, las células infectadas se extrajeron con triclorotrifluoroetano (freón) durante 30 min, con agitación fuerte, para romper las membranas celulares y poder liberar las partículas virales del interior de la células. Las fases se separaron por centrifugación durante 30 min a 10,000 X g a 4°C; la fase acuosa, donde está el virus, se separó y se le agregó polietilenglicol al 50 % hasta obtener una concentración final del 8%. La muestra se incubó toda la noche a 4 C para precipitar el virus. Posteriormente, se centrifugó a 10,000 X g por 20 min a 4°C para bajar las partículas virales precipitadas. El sedimento se resuspendió en 0.3 ml de solución amortiguadora TSM (trizma base 0.05 M, NaCl 0.15 M, MgCl₂ 0.01% pH 8.4). La muestra resuspendida se mezcló con una solución de CsCl con una densidad de 1.36 g/cm³ y se centrifugó a equilibrio (180,000 x g durante 18 hrs). Después de la centrifugación, se colectó la banda opalescente observada y se analizó su composición por electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida 10%. El virus purificado se concentró por medio de ultracentrifugación a 180,000 x g por dos hrs a 4 C, y el botón se resuspendió en solución TS (trizma base 0.05M, NaCl 0.15M pH 8.4), y se guardó a 4°C hasta su uso.

CEPAS BACTERIANAS: La cepa MX614 (lac-pro.galE, ilv-68, thi de E. coli) fue amablemente proporcionada por el Dr. F. Bastarrachea de la UNAM. Esta cepa es constitutiva para la expresión de genes bajo el control del promotor de lac.

ENRIQUECIMIENTO DE LA PROTEINA HIBRIDA: La cepa MX614 transformada con el plásmido pUMA 932 (Fig.1) sintetiza constitutivamente la proteína de fusión VP7-Bgalactosidasa (Fig.2) la cual llega a constituir aproximadamente del 2 al 3 por ciento de la proteína total bacteriana. La proteína se puede enriquecer alrededor de 5 veces mediante repetidas

centrifugaciones a baja velocidad del lisado bacteriano (37). Brevemente; las bacterias recombinantes se colectan por centrifugación a 4000 X g durante 10 min a 4 C, y se resuspenden en 1/10 del volumen inicial de TEN (50 mM Tris pH 7.5, 0.5mM EDTA, 0.3 M NaCl), y se incuba 15 min en hielo con 1mg/ml de lisozima. Posteriormente, se agrega NP-40 a una concentración final de 0.5 % y se incuba 10 min en hielo. Al terminar este periodo, se le agrega a la muestra 1/6 del volumen inicial de 1.5 M de NaCl, 12mM de MgCl₂ y 2 ug/ml de DNAasa I, y se agita sobre hielo por 1 hr. Posteriormente, se centrifuga a 4000 xg durante 15 min a 4 C, y el material del botón se lava tres veces con TEN para finalmente ser resuspendido en un volumen apropiado de TEN. La cuantificación de proteína total bacteriana se estableció por el método de Lowry (38). La determinación de la cantidad correspondiente a la proteína de fusión en cada paso del enriquecimiento se realizó estableciendo la proporción de la proteína híbrida con respecto a las proteínas totales por densitometría a 550 nm, de los geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie (ver inciso GELES) (40).

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA: Las muestras fueron analizadas en geles de acrilamida-bisacrilamida (7.5%-0.2%). Antes de ser aplicadas al gel las muestras fueron hervidas por 3 min con un volumen igual de amortiguador para muestras de Laemmli (41), y centrifugadas por 5 min en una centrifuga Eppendorf, para quitar el material insoluble. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie(41) ó nitrato de plata (42).

SOLUBILIZACION DE LA PROTEINA HIBRIDA: La proteína híbrida enriquecida, o el extracto control tratado paralelamente, fueron solubilizados por un proceso de desnaturalización / renaturalización en condiciones reductoras. Brevemente, las muestras se incubaron durante 1 hr a temperatura ambiente en una solución de urea 8 molar/buffer B (Trizma base 0.05M, MgCl 0.01M, NaCl 0.1M) /0.1M B-mercaptoetanol, agitando con el vortex cada 15 min. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas por 15 min en una centrifuga Eppendorf de mesa y las proteínas en el sobrenadante fueron renaturalizados dializando la urea contra buffer B/ 0.1M B-mercaptoetanol por 16 hrs a 4 C (43). Las muestras recuperadas se centrifugaron 15 min en una centrifuga Eppendorf para separar los agregados que pudieran haberse reformado al quitar la urea. La eficiencia de solubilización se midió determinando la actividad de B-galactosidasa (39) recuperada en el sobrenadante.

ANALISIS EN GRADIENTE DE SACAROSA: Las muestras solubilizadas se corrieron a 4 C en gradientes de sacarosa del 10 al 25%, durante 8 hrs a 40,000 rpm en un rotor SW40 de una ultracentrífuga Beckman. Después de la corrida los gradientes se colectaron en fracciones de 0.3 ml y se determinó la actividad de B-galactosidasa en cada una de las fracciones obtenidas. En tubos separados se corrieron simultáneamente controles de peso molecular. En nuestro caso utilizamos a la B-galactosidasa nativa (monómero de 118 000 de peso molecular y tetrámero de 480 000) , y a la fosfatasa alcalina de intestino de borrego (monómero de 114 000 de peso molecular) localizada también por su actividad (44). Los picos de actividad, así como divisiones equivalentes en volumen del resto del gradiente, se colectaron y se dializaron 2 hrs contra buffer B/ 0.1M B-mercaptoetanol, y posteriormente 2 hrs contra agua destilada, todo a temperatura ambiente. Las muestras dializadas se concentraron alrededor de 300 veces en una evaporadora Savant, y se guardaron a -20 C hasta su posterior análisis en gel SDS-poliacrilamida al 7.5% .

ANALISIS DEL DESPRENDIMIENTO DE LA MONOCAPA CELULAR EN PRESENCIA DE B-MERCAPTOETANOL: El buffer B con diluciones 1:2 de una concentración inicial de 0.2 M de B-mercaptoetanol se utiliza para diluir al rotavirus SA11. Se utilizaron 50 ul de cada dilución para infectar células MA104 de acuerdo al protocolo descrito en el ENSAYO DE NEUTRALIZACION. El desprendimiento celular y la infectividad del rotavirus en cada condición se determinan por observación en un microscopio invertido de contraste de fase.

ENSAYO DE COMPETENCIA: Células MA104 crecidas en monocapa en cajas de plástico de 96 pozos fueron incubadas 15 min a 4 C y posteriormente lavadas con PBS (NaCl 0.15M, fosfatos de sodio 0.01M) a 4 C. Subsecuentemente se incubaron durante 1 hr a 4 C con una cantidad constante de partículas virales de SA11 en buffer B/0.05 M B-mercaptoetanol o distintas concentraciones de la proteína control solubilizada con el mismo amortiguador. El resto del protocolo coincide con el ENSAYO DE NEUTRALIZACION. Para el análisis final se toma como 100% a la cantidad de células infectadas en los pozos en los cuales no se adicionó la proteína.

INMUNIZACIONES: Se utilizaron ratones Balb/c machos de 7 a 9 semanas de edad. En el día 0 de cada protocolo de inmunización

se analizaron los sueros de los ratones por el método de neutralización en placa, para excluir la presencia de anticuerpos neutralizantes anti-SAll que tuvieran un título mayor de 1/50. En el caso del primer protocolo, también se buscó la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación tomando igualmente como límite mayor de exclusión un título de 1/50. Los ratones que cumplieron éstos criterios fueron inoculados subcutáneamente con 200 ul de una emulsión vol/vol de antígeno y adyuvante. En todos los protocolos, menos en los que se especifique lo contrario, la primera inmunización fue con adyuvante completo de Freund y las subsiguientes con adyuvante incompleto. Los ratones fueron sangrados a los tiempos indicados y los sueros obtenidos fueron inactivados por 30 min a 60°C, y centrifugados 10 min en una centrifuga Eppendorf de mesa para remover cualquier residuo de células sanguíneas. Los sueros así procesados se guardaron a 4 C hasta ser utilizados.

ENSAYO DE NEUTRALIZACION: Los títulos de anticuerpos neutralizantes en los sueros de los ratones se determinaron por el método de Shaw (46). En la figura 3 se esquematizan los pasos de éste método. El título de neutralización se definió como el inverso de la dilución del suero necesaria para reducir en por lo menos un 60% el número de células infectadas, al compararse con los pozos controles, en los cuales se utilizó PBS en lugar de suero, i.e., 100% de infectividad=0% neutralización.

INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION: Cada muestra de suero diluida serialmente en PBS/0.2% RSA (albumina sérica de conejo), fue mezclada con un volumen igual de éste diluyente conteniendo cuatro unidades hemaglutinantes del virus SAll. A 50 ul de ésta mezcla se le adicionaron 50 ul de eritrocitos humanos tipo O al 0.4% en PBS/0.2% RSA. La inhibición de la hemaglutinación fue evaluada a los 90 min de incubación a temperatura ambiente.

ESTADISTICA: Las diferencias entre los valores de las medias (de títulos neutralizantes, de inhibición de hemaglutinación, de índice de competencia) de sueros o proteínas controles y sueros o proteínas experimentales en los distintos ensayos fueron examinadas utilizando las distribuciones de tipo t, con las restricciones de que las varianzas de las poblaciones fueran iguales, las muestras pequeñas ($n < 30$), las poblaciones normalmente distribuidas y la σ desconocida (47).

Fig.1 ENSAYO DE NEUTRALIZACION DE LA INFECCION VIRAL

EXPERIMENTAL

Incubación de las diluciones del suero problema (50 ul) con el virus (50 ul de lisado)



Adsorción de las partículas virales no neutralizadas a células crecidas en monocapa



12 hrs de incubación a 37 C (un ciclo de replicación viral)



Revelado de las células infectadas con anticuerpos anti-virus : proteína A unida a peroxidasa : un sustrato precipitable de la peroxidasa



El título de anticuerpos neutralizantes del suero analizado, se define como la dilución de éste a la cual se neutraliza cuando menos el 60 % de la infectividad viral

CONTROL

Incubación del virus (50 ul de lisado) con PBS



El número de células infectadas se toma como el 100 % de infectividad viral



ENRIQUECIMIENTO DE LA PROTEINA VP7-B-GALACTOSIDASA

Inicialmente se exploró la posibilidad de purificar a la proteína híbrida a partir de un cultivo de bacterias crecido hasta la fase estacionaria, utilizando una columna de afinidad para la B-galactosidasa (30). Aunque éste procedimiento, aplicado repetidas veces, enriquecía considerablemente a los dos polipéptidos híbridos, la cantidad recuperada era insuficiente para realizar un estudio de sus propiedades inmunológicas.

Por lo anterior, y partiendo de la observación de que gran parte de la actividad de B-galactosidasa permanecía en una de las pastillas de desecho resultante de una centrifugación a baja velocidad en el protocolo inicial de purificación por afinidad, decidimos aprovechar ésta aparente insolubilidad para enriquecer a la proteína híbrida.

Siguiendo el protocolo descrito por Kleid et al. (37, ver MATERIALES Y METODOS), pudimos obtener hasta 40 mg de los polipéptidos híbridos por litro de medio de cultivo, enriqueciéndose cada uno de ellos hasta representar aproximadamente un 15% de las proteínas totales bacterianas (Fig.4). Además de las dos proteínas híbridas también observamos el enriquecimiento de un tercer polipéptido de alrededor de 135 kd de peso molecular.

SOLUBILIZACION

Aunque la insolubilidad de la proteína híbrida permitió el poder enriquecerla con un protocolo sencillo, los experimentos de competencia requerían que ésta estuviera en forma soluble.

Marchesi (43) había observado que la B-galactosidasa nativa tendía a formar agregados multiméricos que podían dispersarse al ser tratados con urea, y que después de quitar la urea por diálisis contra un amortiguador con B-mercaptoetanol, la forma que se volvía predominante (95%) era la tetramérica.

Siguiendo ésta observación, decidimos probar si la proteína híbrida podía ser solubilizada con urea y posteriormente

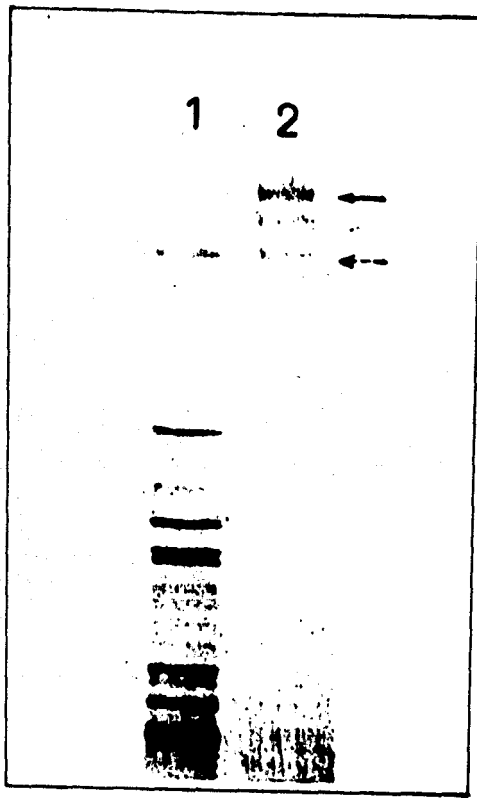


Fig.4 (A) Análisis en un gel 7.5% de poliacrilamida-SDS de los polipéptidos de fusión enriquecidos por centrifugación a baja velocidad. (1) Proteínas totales de *E. coli* MX614(pUMA932). (2) Proteínas en la pastilla obtenida por centrifugación a baja velocidad del lisado de *E. coli* MX614(pUMA932). Después de la electroforesis el gel fue teñido con azul de Coomassie y analizado densitométricamente. La flecha continua muestra el producto esperado de 145 kd, y la discontinua el producto de la iniciación interna.

permanecer soluble si la urea se dializaba contra un amortiguador que tuviera B-mercaptoetanol. Distintas cantidades de la proteína híbrida enriquecida se trataron con urea y luego se dializaron contra un amortiguador con B-mercaptoetanol 0.1M (58). Los resultados de un experimento representativo mostrando la solubilización de VP7-B-galactosidasa se presentan en la Tabla I.

Si comparamos entre cantidades equivalentes de proteína híbrida que fueron o no tratadas con urea (Tabla I; experimentales contra controles), nos damos cuenta que este tratamiento nos puede aumentar hasta 250 veces la cantidad de VP7-B-galactosidasa soluble. Independientemente a la cantidad de proteína híbrida solubilizada inicialmente con urea, la concentración máxima de VP7-B-galactosidasa que se mantuvo soluble después de dializar la urea, fue de 67 ug/ml.

Debido a que para los experimentos de competencia tendríamos que usar a la VP7-B-galactosidasa en presencia de B-mercaptoetanol, probamos el efecto de este agente reductor sobre la estabilidad de la monocapa de células en cultivo, y sobre la infectividad viral. Estos dos efectos se analizan en un ensayo de inmunoperoxidasa, como se describe en MATERIALES Y METODOS.

Se observó que el B-mercaptoetanol causa desprendimiento celular a concentraciones iguales o mayores a 0.1M y no altera la infectividad viral a ninguna de las concentraciones probadas (la máxima concentración probada fue de 0.2M).

Ya que los resultados reportados en la Tabla I fueron obtenidos utilizando 0.1M B-mercaptoetanol en el buffer de diálisis, concentración que era demasiado alta para ser utilizada en los experimentos de competencia, exploramos el efecto de concentraciones decrecientes de B-mercaptoetanol en la solubilización de VP7-B-galactosidasa, partiendo de 160 ug/ml de la proteína de fusión (Tabla II).

Como podemos apreciar, con 0.05M de B-mercaptoetanol logramos una solubilización por lo menos equivalente a la lograda con 0.1M. Debido a esto, de aquí en adelante, las proteínas solubilizadas con urea se dializaron contra buffer B/0.05M B-mercaptoetanol.

ANÁLISIS DEL ESTADO DE AGREGACIÓN DE LA PROTEÍNA HÍBRIDA SOLUBILIZADA

Para conocer el estado de agregación de la proteína híbrida solubilizada, las muestras, después de haber sido tratadas con

TABLA I. Solubilización de la proteína híbrida VP7-B-galactosidasa.

a	b	c	d
CONCENTRACION INICIAL DE VP7-B-gal (ug/ml)	ACTIVIDAD INICIAL DE B-gal	ACTIVIDAD TOTAL DE LA MUESTRA DIALIZADA	ACTIVIDAD EN EL SOBRENADANTE DE LA MUESTRA DIALIZADA
6	1.47	1.58	1.11
18	9.59	4.76	5.25
54	28.44	9.69	8.11
162	111.9	46.6	46.6
486	287.8	72.9	39.9
Controles^e			
18	9.59	0.98	0.02
162	111.9	3.72	3.68

a Concentración inicial solubilizada de la proteína VP7-B-galactosidasa. La cantidad inicial de VP7-B-galactosidasa solubilizada se calculó considerando que representa aproximadamente un 15% del total de la proteína híbrida enriquecida (31), la concentración de la cual fue a su vez determinada por el método de Lowry (38).

b Actividad total (pastilla y sobrenadante) inicial de B-galactosidasa en la muestra al inicio del protocolo de solubilización. Una unidad de actividad de B-galactosidasa se define como la cantidad de enzima que hidroliza un nmol de ONPG (o-nitrofenil B-D-galactopiranosido) hidrolizados/min/ml (39).

c Actividad de B-galactosidasa en la muestra después de la diálisis para eliminar la urea (ver MATERIALES Y METODOS, inciso SOLUBILIZACION).

d Actividad de B-galactosidasa en el sobrenadante recuperado de la centrifugación posterior a la diálisis (ver MATERIALES Y METODOS, inciso SOLUBILIZACION).

e Muestras que no fueron tratadas con urea pero compartieron el resto del protocolo de solubilización con las muestras experimentales.

TABLA II. Efecto de la concentración de B-mercaptoetanol sobre la solubilización de VP7-B-galactosidasa.

[B-mercaptoetanol]M ^a	Actividad de B-galactosidasa en sobrenadante ^b
0.0125	26.7
0.025	52.2
0.05	125.6
0.1	105.5

a
Concentración de B-mercaptoetanol que se mantuvo a través de todo el protocolo de solubilización (ver MATERIALES Y METODOS).

b
Actividad de B-galactosidasa recuperada en forma soluble iniciando con una cantidad a solubilizar de 162 ug de VP7-B-galactosidasa (Tabla I). Una unidad es la cantidad de enzima que hidroliza un nmol de ONPG /min/ml (22).

urea y dializadas contra buffer B/0.05M B-mercaptoetanol, fueron analizadas por gradiente de velocidad en sacarosa. Los resultados del análisis de un gradiente representativo se muestran en la Figura 5.

Vemos claramente como la principal actividad de B-galactosidasa de la proteína híbrida comigra con el pico de actividad de los tetrámeros (472 kd) de la B-galactosidasa nativa (Fig.5A).

En los perfiles de actividad, tanto de la proteína híbrida como de la nativa, aparece un segundo pico de actividad. Este pico comigra, en los gradientes de sacarosa, con la actividad de fosfatasa alcalina de intestino de becerro de peso molecular de 140 Kd (51) y cuya forma activa es un monómero (Fig.5B).

Por lo anterior podemos suponer que la proteína híbrida solubilizada (98 a 99 % de la actividad total recuperada), se encuentra en su mayor parte en forma de tetrámeros (del 55 al 96 %), y solamente una porción (del 2 al 25%) se encuentra en forma de monómeros.

La actividad observada en el pico menor se debe probablemente a la reasociación de monómeros para formar tetrámeros durante el tiempo que toma el montar el ensayo para la detección de la actividad de B-galactosidasa.

Quisimos también determinar si habíamos solubilizado los dos productos híbridos, y si ambos participaban en la formación de tetrámeros. Para esto las fracciones del gradiente de sacarosa, divididas como se muestra en el panel A de la Figura 6, fueron analizadas por electroforesis en geles de acrilamida.

Como podemos ver, los dos polipéptidos híbridos se solubilizan y ambos participan en la formación de los tetrámeros y mantienen una fracción en forma de monómeros.

INHIBICION DE LA INFECTIVIDAD VIRAL POR COMPETENCIA

Las evidencias existentes sugieren que es a través de la proteína VP7 que los rotavirus interaccionan con su receptor en las células huésped. Para explorar la posibilidad de que la proteína híbrida VP7-B-galactosidasa mantuviera en su estructura sitios de unión al receptor realizamos un experimento de competencia directa entre el rotavirus de simio SA11 y la proteína híbrida por los receptores del virus en células MA104.

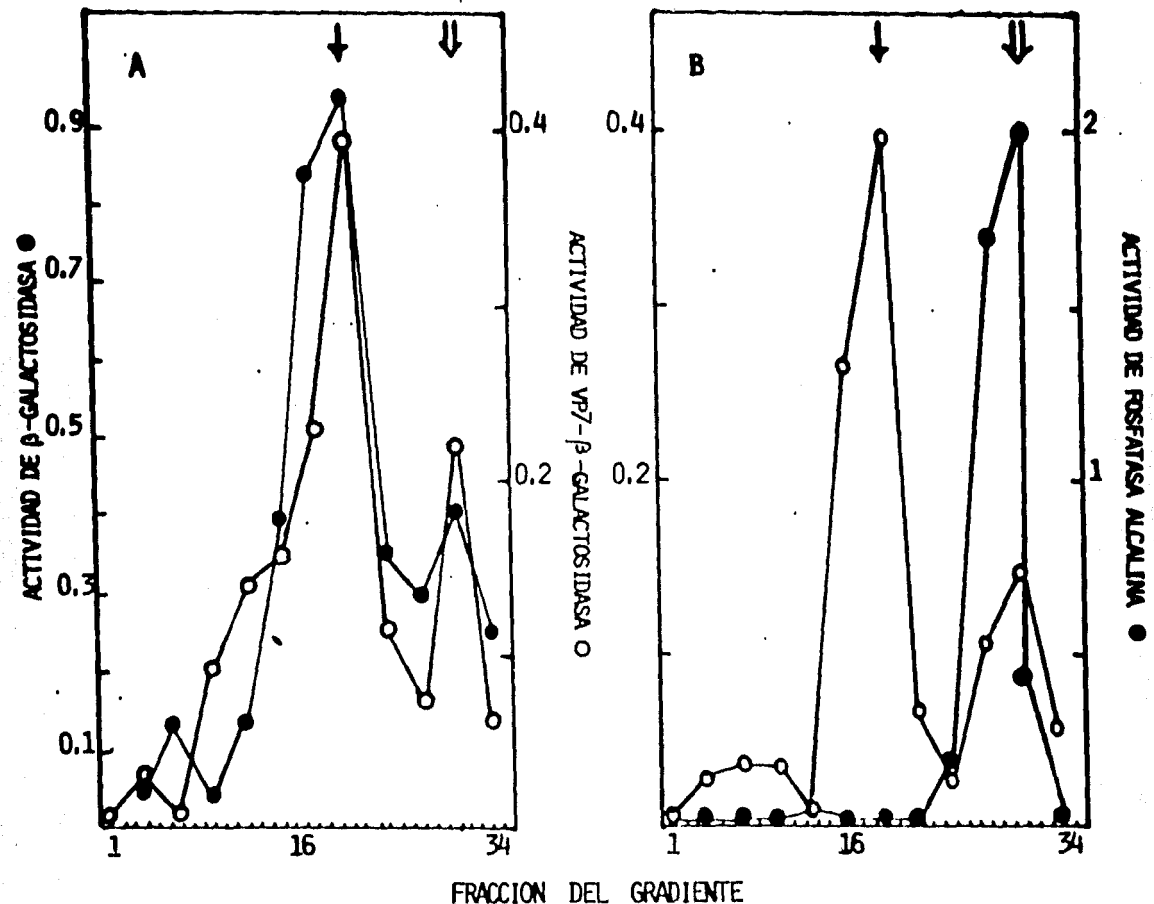


Fig.5 Análisis por sedimentación en gradiente de sacarosa del estado de agregación de la proteína VF7- β -gal. (A) Perfil de actividad (D.O. a 420 nm en las fracciones de un gradiente de sacarosa del 10 al 25% en el ensayo de β -galactosidasa). (●) Perfil de la β -galactosidasa silvestre. (○) Perfil de la solución de proteína híbrida enriquecida y solubilizada. La flecha sencilla muestra el pico de actividad de los tetrámeros (472 kd) de β -galactosidasa. La flecha doble muestra el pico menor correspondiente probablemente al monómero (118 kd) de ésta misma. (B) (○) Perfil de actividad de la β -galactosidasa de la proteína híbrida enriquecida y solubilizada, y (●) perfil de actividad (D.O. a 450 nm en el ensayo de actividad de fosfatasa alcalina) de la fosfatasa alcalina. La flecha doble muestra la posición de los monómeros activos de la fosfatasa alcalina (145 kd).

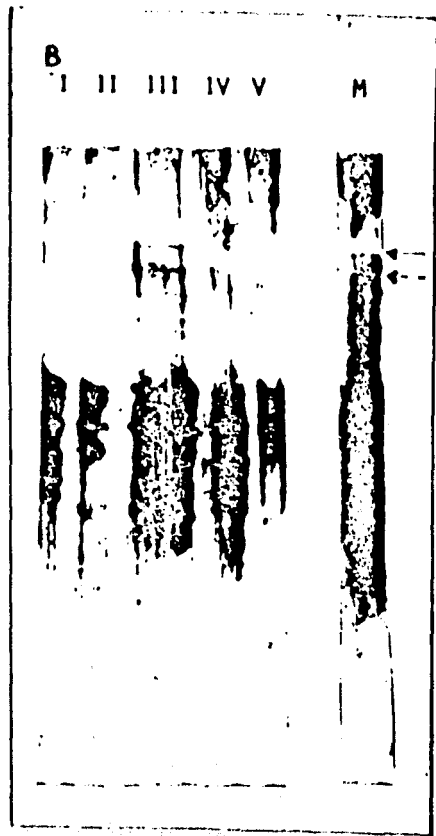
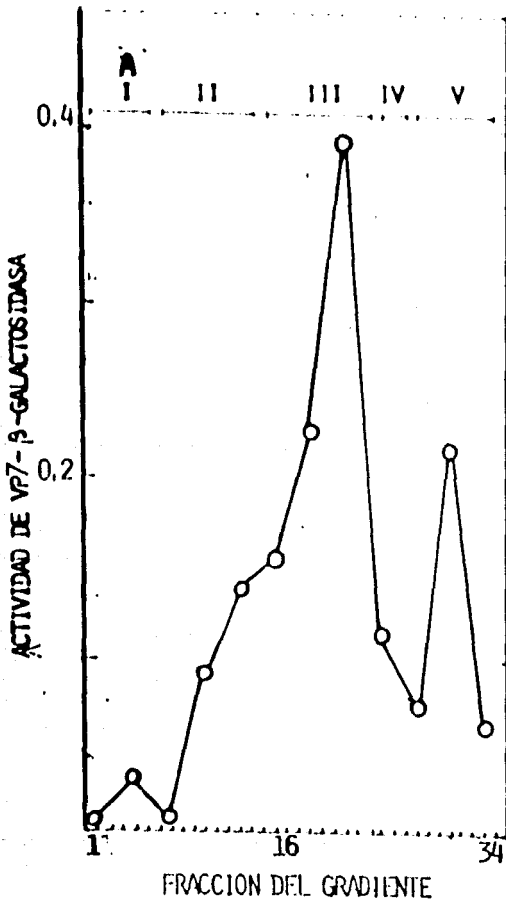


Fig.6 (A) Fraccionamiento de las formas multiméricas de la VP7-galactosidasa por un gradiente de sacarosa del 10 al 25% , y su análisis en (B)un gel 7.5% de poliacrilamida-SDS .Despues de corrido el gel se tiñó con nitrato de plata. Los distintos carriles corresponden a cada uno de los grupos de fracciones, especificador en la parte superior de (A). la flecha continua muestra la proteína híbrida de 145 kd y la flecha discontinua el otro producto híbrido de 116 kd. (M) Corresponde a la muestra original antes de ser fraccionada por el gradiente.

Como control se utilizaron en cada punto cantidades equivalentes de proteínas de E. coli Mx614 las cuales se procesaron a través de los protocolos de enriquecimiento y solubilización al igual que la proteína VP7 B-galactosidasa.

Los resultados que se muestran en la Figura 7 indican que la presencia de la proteína híbrida en el ensayo de infección disminuye la cantidad de células infectadas, cuando se mantiene constante el número de partículas virales. Esta inhibición es dosis dependiente. La comparación de la curva experimental con la curva control mediante el Student t test muestra en todos los puntos mostrados una diferencia significativa de con una p de por lo menos $p > 0.05$.

Con $6 \mu\text{g/ml}$ (4×10^{-8} M) de la proteína VP7 B-galactosidasa se obtiene una inhibición del 50% de las células infectadas, mientras que una cantidad equivalente de las proteínas control solo inhibe la infección en aproximadamente un 10%. La proteína control también muestra una inhibición de alrededor de 50%, pero solamente a concentraciones altas ($224 \mu\text{g/ml}$, el dato no se muestra), lo que probablemente se deba a efectos inespecíficos. Es importante notar que las concentraciones graficadas en la abscisa de la Figura 7 muestran la concentración molar de VP7-B-galactosidasa independientemente de su estado de agregación. Si consideramos que la mayor parte de la proteína híbrida se encuentra en forma de tetrámeros, la concentración inhibitoria efectiva de VP7 abarca un rango hasta aproximadamente cuatro veces menor.

Se observa también en la curva control una potenciación de la infectividad viral a las concentraciones más bajas de proteína bacteriana preparación. La observación en sí, de ser un fenómeno consistente, ameritaría la búsqueda del factor bacteriano que causa el fenómeno. En el presente trabajo no se persiguió su esclarecimiento.

La interpretación más sencilla para la inhibición de la infectividad viral por la VP7-B galactosidasa, es que la región de VP7 correspondiente al sitio de interacción con el receptor celular está conservada en la proteína híbrida, y compite con el virus en su unión al receptor durante la adsorción a la célula.

INDUCCION DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES

El segundo tipo de sitios funcionales que nos interesaba caracterizar en la proteína híbrida eran los epitopes de

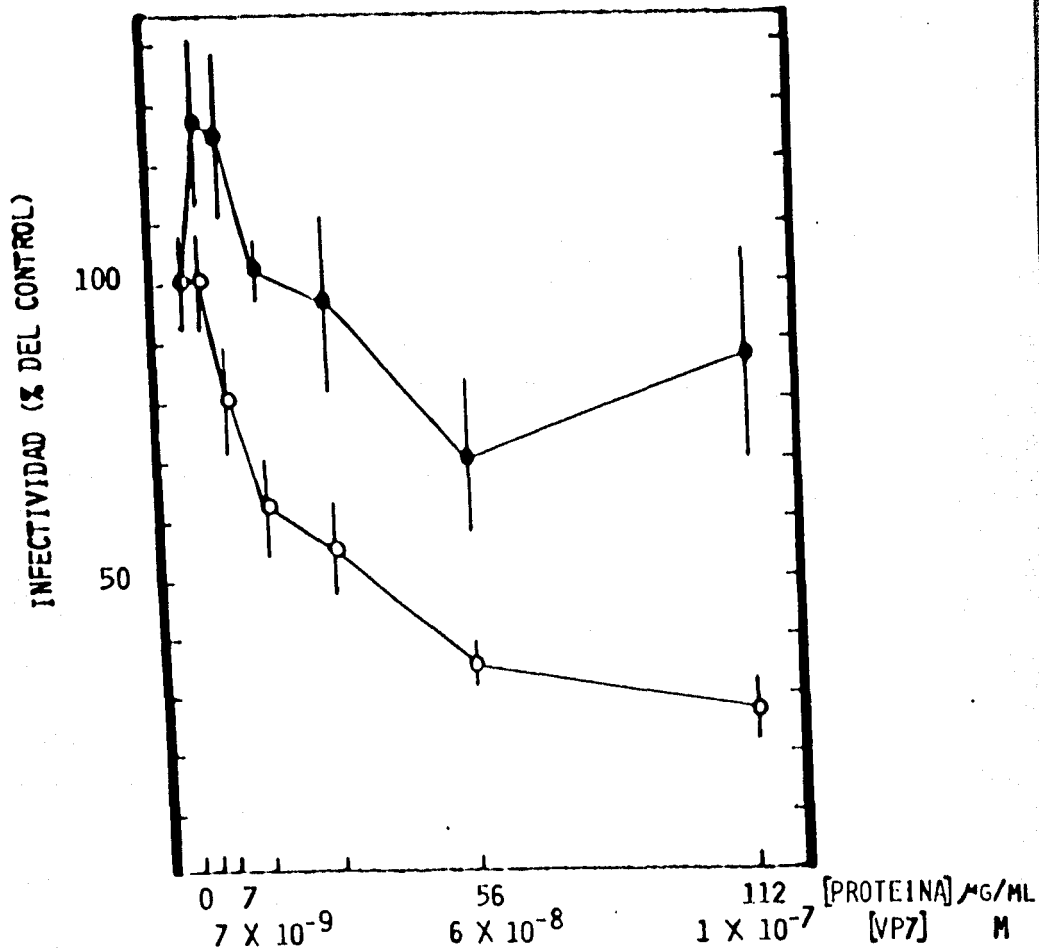


Fig.7 Efecto de la proteína VP7-galactosidasa sobre la infectividad del SA11. Diferentes concentraciones de (○) VP7-B-galactosidasa enriquecida y solubilizada, o de (●) proteína control bacteriana, fueron coincubados a 4 C con una cantidad fija del virus SA11 durante el periodo de adsorción. El número de células infectadas se cuantificó posteriormente por el mismo método descrito en el ensayo de neutralización (ver MATERIALES Y METODOS). Los datos se expresan como porcentaje de la infectividad control tomando como 100% a la cantidad de células infectadas al coincubar a las células con SA11 y buffer B/0.05M B-mercaptoetanol.

neutralización. Para determinar su presencia se diseñó el protocolo de inmunización que se presenta en la Tabla III. Se utilizaron como inmunógenos a la proteína VP7 B-galactosidasa enriquecida (conteniendo aproximadamente 7 ug de la porción correspondiente a VP7 en las primeras 2 inoculaciones y 30 ug en las 2 siguientes) y como control una cantidad equivalente de proteína bacteriana procesada con el mismo protocolo de enriquecimiento que se utilizó para obtener el polipéptido de fusión. También se incluyó un grupo de ratones que recibieron 45 ug de virus SA11, cantidad suficiente para tener 7 ug de la glicoproteína VP7.

Los resultados de éste protocolo de inmunización se muestran en la figura 8, donde podemos observar que:

a) La proteína híbrida VP7 B galactosidasa sintetizada en *E. coli* es capaz de inducir anticuerpos neutralizantes contra SA11, marcándose diferencias significativas ($p < 0.05$ al día 14; $p < 0.05$ al día 28, y $p < 0.025$ al día 42 del protocolo de inmunización descrito en la Tabla III) entre los títulos neutralizantes de sueros de ratones inoculados con VP7-B-galactosidasa y los títulos de anticuerpos neutralizantes de sueros de ratones controles.

b) Cuatro inoculaciones, dando un total de 70 ug de VP7 en su forma de proteína de fusión por ratón, inducen un título de anticuerpos neutralizantes equivalente a los títulos obtenidos por inoculación de la proteína VP7 purificada directamente de la partícula viral (24,36,50), en dosis aproximadamente equivalentes.

c) La partícula viral entera en las dosis descritas en la Tabla III, induce anticuerpos neutralizantes en una proporción aproximadamente 20 veces mayor a los inducidos por la proteína híbrida.

ESTABLECIMIENTO DE UNA RESPUESTA INMUNE SECUNDARIA

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en la sección anterior, decidimos analizar si un aumento en la dosis de la proteína VP7-B-galactosidasa podía inducir un mejor título de anticuerpos neutralizantes. Además de esto resultaría interesante evaluar la posibilidad de que ratones previamente inmunizados con la proteína híbrida pudieran responder de manera secundaria ante una posterior inmunización con el rotavirus SA11.

Probamos por lo tanto dos diferentes cantidades de VP7-B-

TABLA III. Protocolo de inmunización para determinar la capacidad de inducción de anticuerpos neutralizantes por la VP7-B-galactosidasa.

Inmunógeno	# Ratones	Dosis (ug) en el día indicado ^a			
		0	14	29	44
		AC	AI		
VP7-B-gal ^c	5	250 (7) ^b	250 (7)	1000 (28)	1000 (28)
Control ^d	2	250	250	1000	1000
Virus SA11	2	45 (7)	45 (7)	45 (7)	45 (7)

^a Dosis por ratón.

^b El valor entre paréntesis muestra la cantidad de ug correspondiente a la porción de VP7 contenida en el total inoculado.

^c Proteínas bacterianas de *E. coli* MX614 / pIIM0937 enriquecidas para el polipéptido híbrido VP7-B galactosidasa. La proteína de fusión representa aproximadamente el 15% de la proteína total.

^d Proteínas bacterianas de *E. coli* MX614 sin el plásmido recombinante tratadas paralelamente a las muestras experimentales en el protocolo de enriquecimiento.

AC=Inoculación con adyuvante completo de Freund.

AI=Inoculación con adyuvante incompleto de Freund.

galactosidasa para inducir anticuerpos neutralizantes, y el efecto de éstas inmunizaciones sobre la respuesta de los animales a un posterior contacto con el rotavirus SA11. El protocolo de inmunización se describe en la tabla IV.

Los datos presentados en la Figura 9 muestran que el aumentar la dosis de la proteína híbrida no aumenta la producción de anticuerpos neutralizantes (comparar día 35 de la Figura 9 con el día 35 de la Figura 8).

Sin embargo, es claro que al inocular con el rotavirus SA11, tanto la velocidad de respuesta, como la magnitud y la duración de la producción de anticuerpos neutralizantes aumenta en los animales sensibilizados con la VP7 B galactosidasa respecto a los que recibieron con la proteína control. Estas características son las que determinan la presencia de una respuesta inmune de tipo secundario.

En todos los tiempos (menos en el día 98 para los 300 ug de VP7 y en el día 42 para los 30 ug de VP7) se registra una diferencia significativa (desde $p < 0.1$ hasta $p < 0.001$), entre controles y experimentales.

Esta respuesta inmune secundaria en los animales inoculados previamente con la proteína híbrida, es independiente a un aumento en la dosis administrada, ya que no hay diferencias significativas entre la sensibilización con 30 y 300 ug de VP7.

Los resultados anteriores sugieren que la proteína híbrida comparte al menos algunos epitopos neutralizantes con la VP7 del SA11.

SENSIBILIZACION DE LA RESPUESTA INMUNE

En algunos sistemas se ha demostrado que dosis subinmunizantes de un antígeno viral han resultado suficientes para provocar el establecimiento de células de memoria que dan lugar a una respuesta inmune secundaria ante un contacto posterior con el mismo antígeno o antígenos relacionados con éste (46,52).

Esta sensibilización depende también del tiempo transcurrido entre la inmunización sensibilizante y el contacto posterior (46), debido muy probablemente al tiempo necesario para el establecimiento de las clones de memoria.

TABLE IV. Protocolo de inmunización para determinar la respuesta secundaria de anticuerpos neutralizantes hacia el rotavirus de simio SA11, en animales previamente inoculados con VP7-B-galactosidasa.

# Ratones	a		b	
	Dosis e inmunógeno inoculado al día indicado			
	0	14	28	42
	AC	AI		
4	VP7-B-gal (30 ug) 1 mg	c (30 ug) 1 mg	(30 ug) 1 mg	SA11 (9 ug) 60 ug
4	VP7-B-gal (300 ug) 10 mg	(300 ug) 10 mg	(300 ug) 10 mg	SA11 (9 ug) 60 ug
2	Control 10 mg	10 mg	10 mg	SA11 (9 ug)

^a Cantidad por ratón de proteína total bacteriana o de virus purificado. Entre paréntesis se muestra la cantidad de VP7 presente en el inmunógeno total utilizado.

^b Los tipos de inmunógeno corresponden a los ya descritos en la Tabla I.

^c Cuando no se especifica el inmunógeno debe de asumirse que es el mismo que el de su izquierda.

AC=Inoculación con adyuvante completo de Freund.

AI=Inoculación con adyuvante incompleto de Freund.

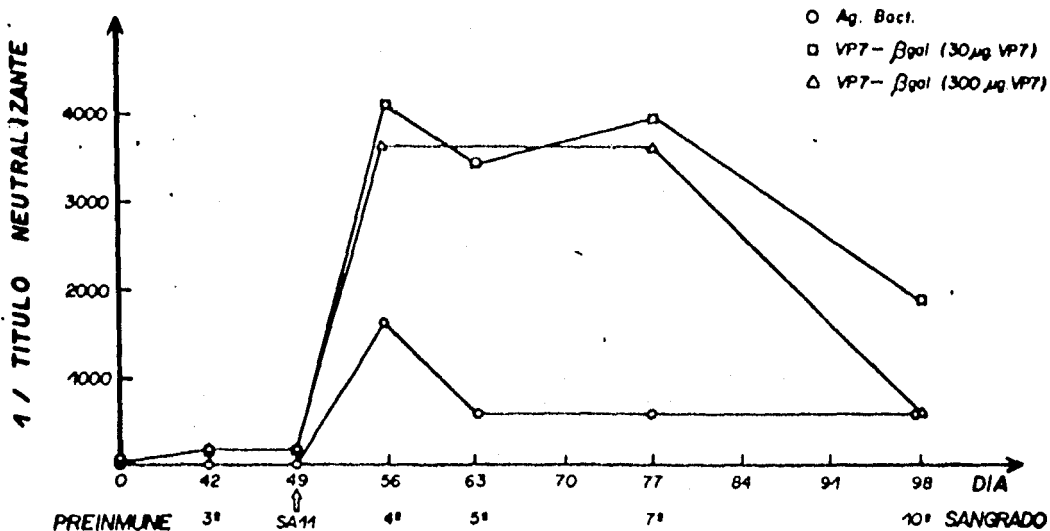


Fig.9 Inducción de anticuerpos neutralizantes por el rotavirus SA11 en ratones previamente inmunizados con 30 ug (□) ó 300 ug (△) de las secuencias de VP7 en la proteína híbrida enriquecida, ó con el equivalente en proteína total de las proteínas control(○). Se muestran los títulos alcanzados en el sangrado preinmune (día 0) y después de tres inculaciones con el antígeno correspondiente (día 42) antes de la inmunización con el rotavirus SA11 (flecha).

Para analizar la capacidad de nuestra proteína híbrida de sensibilizar la respuesta inmune hacia epitopes neutralizantes del virus SA11, establecimos el protocolo esquematizado en la Tabla V.

Los resultados obtenidos de este esquema de inmunización mostraron que no hubo efecto de sensibilización claro a los 7 post-sensibilización (datos no presentados). En la Tabla VI se presentan los datos de inducción de anticuerpos neutralizantes cuando el virus SA11 se inoculó a los 21 días después del estímulo sensibilizador.

Los títulos de anticuerpos neutralizantes obtenidos al inmunizar con el virus SA11 35 días después de la sensibilización con VP7-B-galactosidasa, son comparables a los obtenidos con los ratones 3 y 4 del grupo correspondiente a esta sensibilización a día 21 (Tabla VI). Sin embargo, éstos datos no son conclusivos, ya que el grupo experimental de los 35 días acabó teniendo 2 ratones.

Aunque la respuesta al SA11 a los 21 días después de una sensibilización con VP7-B-galactosidasa es heterogénea, es claramente superior a la de los controles. El título neutralizante se mantiene superior al de los controles aún después de varias semanas.

El efecto observado no se debe a una reacción tardía al estímulo inicial (ver VP7-B-gal sin inoculación de virus a los 21 días, Tabla VI), ni a un efecto inespecífico del adyuvante potenciando la posterior respuesta al SA11 (ver AC, Tabla VI).

El título máximo de anticuerpos neutralizantes en animales sensibilizados con VP7-B-gal se obtiene desde la primera semana y para los controles se obtiene hasta la tercera semana después de la inmunización con SA11. Lo anterior arguye también a favor de la presencia de una respuesta secundaria en los animales experimentales y una respuesta inmune primaria en los controles.

Por todo lo anterior podemos afirmar que una sola dosis subinmunizante de la proteína VP7-B-gal es capaz de establecer, en nuestro sistema, la capacidad de evocar una respuesta inmune secundaria de anticuerpos neutralizantes ante un contacto posterior con SA11. Esta sensibilización depende del período entre las inoculaciones (probablemente desde los 21 días en adelante) y dura hasta por lo menos seis semanas después de la inmunización con el virus.

NEUTRALIZACIÓN DE OTROS SEROTIPOS

Se ha definido a la glicoproteína VP7 como la principal

INMUNOGENO INOCULADO
AL DIA INDICADO

0	7	21	35
AC		AI	
VP7-B-gal ^a	SA11 ^b		
Control ^c	SA11		
VP7-B-gal		SA11	
Control		SA11	
VP7-B-gal			SA11
Control			SA11
AC		SA11	
VP7-B-gal			

^a Inmunógeno preparado como se describe en la Tabla III. Cada ratón recibió en total 10 mg de proteína bacteriana, conteniendo aproximadamente 300 ug de secuencias de VP7.

^b Cada ratón recibió 60 ug totales de proteínas virales conteniendo aproximadamente 9 ug de la glicoproteína VP7.

^c Inmunógeno preparado como en la Tabla III. Cada ratón recibió 10 mg totales de proteína bacteriana.

AI= Inoculación con adyuvante incompleto de Freund's.

AC= Inoculación con adyuvante completo de Freund's.

TABLA VI. Sensibilización de la respuesta inmune hacia el rotavirus SA11 por el polipeptido híbrido VP7-B-gal.^d

DIA	0	21	28	35	42	63
Inmunógeno ^a Sensibilizante	TITULO NEUTRALIZANTE ^b					
VP7-B-gal	<50	100	25600	25600	12800	12800
	<50	<50	12800	12800	1600	1600
	<50	<50	6400	1600	3200	3200
	<50	<50	3200	1600	3200	3200
Control	<50	<50	200	100	400	200
	<50	<50	400	200	800	400
	<50	<50	800	800	1600	800
	<50	<50	800	400	*	
AC	<50	<50	800	400	800	400
	<50	<50	800	400	400	400
VP7-B-gal ^c	<50	<50	<50	<50	<50	<50
	<50	<50	<50	<50	<50	<50

^a Los inmunógenos corresponden a los descritos en la Tabla V.

^b Inverso del título neutralizante a los días correspondientes en el protocolo de la Tabla V. El rotavirus SA11 fue inoculado al día 21 del mencionado esquema.

^c En este grupo de ratones se omitió la inoculación con SA11.

^d El virus se inoculó 21 días después del estímulo sensibilizante.

* Murió.

determinante del serotipo viral (18,49,53), definiéndose como perteneciente a algún serotipo a aquel virus que es neutralizado por los anticuerpos inducidos por virus pertenecientes al mismo serotipo, pero no por aquellos pertenecientes a otros serotipos.

La proteína VP7-B-galactosidasa presenta epítopos que inducen anticuerpos neutralizantes para SA11. Estos epítopos son, por lo menos parcialmente, compartidos por la VP7 de la partícula viral entera. Por otro lado, no se descarta la posibilidad de la presencia de otros epítopos de neutralización que no sean inmunogénicos cuando se encuentran en la glicoproteína incorporada al virus, pero si lo sean en la forma en que son presentados al sistema inmune en la VP7-B-galactosidasa.

Estos epítopos a su vez, podrían inducir anticuerpos que neutralizaran a varios serotipos, como se ha demostrado con anticuerpos monoclonales contra VP7 que son capaces de neutralizar heterotípicamente (49,85). Surge por todo lo anterior la pregunta: ¿Son los anticuerpos neutralizantes inducidos por la VP7-B-galactosidasa específicos de serotipo?

Para contestar esta pregunta se analizaron los sueros de los experimentos descritos en la Tabla III (tres sueros del grupo inoculado con VP7-B-galactosidasa con títulos contra SA11 de 1/800, 1/800 y 1/1600, y dos sueros del grupo de ratones inoculados con SA11 con títulos contra SA11 de 1/51200 y 1/19200), y en la Tabla V (dos sueros de ratones sensibilizados con VP7-B-galactosidasa y, 21 días después, inmunizados con SA11, con títulos contra SA11 de 1/25600 y 1/12800) para neutralizar la infectividad de rotavirus pertenecientes a otros serotipos, como lo son el Wa (serotipo 1) y el ST3 (serotipo 4).

Los resultados obtenidos muestran (títulos neutralizantes heterólogos de 1/100 como máximo, versus los títulos neutralizantes homólogos descritos en el párrafo anterior), claramente que la VP7-B-galactosidasa al igual que el rotavirus SA11, induce anticuerpos neutralizantes para el serotipo 3, pero no lo hace para los serotipos 1 y 4.

DISCUSION

VP7, la glicoproteína de superficie del rotavirus de simio SA11, se sintetiza en *E. coli* como un producto de fusión con la B-galactosidasa bacteriana. Este producto es estable, llegando a constituir hasta el 2% del total de las proteínas de la bacteria.

Esta proteína híbrida tiende a formar agregados cuando no está en presencia de agentes reductores. Esto es probablemente reflejo del comportamiento de la región de B-galactosidasa, ya que agregados de la enzima bacteriana pueden disociarse y mantenerse en solución solo en presencia de B-mercaptoetanol (43).

Aprovechando esta propiedad, la proteína híbrida se puede enriquecer en el extracto bacteriano, hasta representar el 15% del total de proteínas bacterianas, por un sencillo protocolo de centrifugaciones repetidas a baja velocidad.

Además de la proteína híbrida esperada y el producto del iniciación interno en el gene de VP7, se enriquece una banda de 135 kd que no está presente en las proteínas bacterianas control (cepa MX614 sin el plásmido recombinante pUMA932), tratadas con el mismo protocolo de enriquecimiento. Esta banda podría ser entonces un producto no identificado hasta ahora del plásmido pUMA932, relacionado con VP7-B-galactosidasa, o un producto bacteriano que se asocia específicamente con la forma agregada de las proteínas híbridas.

Siendo que este producto no se purifica por afinidad de B-galactosidasa, y que tanto la B-galactosidasa como la región clonada de VP7 se han secuenciado totalmente y no se les han encontrado otros sitios de iniciación o terminación de traducción (25,75), la posibilidad de que esta proteína provenga de otro sitio de iniciación interno y/o una traducción que continúe más allá de la región codificadora para la B-galactosidasa es pequeña. No se puede descartar totalmente que esta proteína contenga secuencias de VP7 (por degradación del producto de 145 kd), ni que éstas pudieran contribuir a la generación de anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, lo anterior no afecta nuestros resultados en cuanto a que la construcción de VP7-B-galactosidasa, tenga o no productos de degradación, ofrece un inmunógeno importante para la inducción de anticuerpos neutralizantes (aspecto que se tratará más ampliamente posteriormente en este mismo capítulo de DISCUSION).

La forma agregada de la proteína VP7-B-galactosidasa posiblemente representa una ventaja para su utilización en los ensayos de inducción de inmunidad, ya que se ha reportado que una limitación en la difusión libre de un antígeno *in vivo*, se correlaciona con su efectividad inmunogénica (45).

Aunque la insolubilidad de la proteína híbrida resultó conveniente para algunos de nuestros propósitos, el ensayo de competencia con el virus requería que la proteína estuviera en su forma soluble. Ésta solubilización se logró en urea 8 M, la cual se dializó posteriormente contra un amortiguador con β -mercaptoetanol.

El análisis del estado de agregación de la forma soluble de la proteína híbrida de VP7-B-galactosidasa, mostró que ésta se encuentra mayoritariamente como tetrámeros, con una pequeña población en forma de monómeros. Sin embargo, debido a que la proteína de 118 kd también se encuentra como tetrámero, y comigra en los gradientes de sacarosa con VP7-B-galactosidasa, no podemos afirmar definitivamente si los tetrámeros se forman por una asociación mixta de estas proteínas, o si existen tetrámeros constituidos exclusivamente por cada una de ellas.

La exploración de las condiciones de solubilización de la proteína híbrida y del estado de agregación de la misma, permite un mejor conocimiento de la forma molecular con que se trabaja, y a su vez, una mejor interpretación y diseño de futuros experimentos con esta proteína. Nos da, además seguridad sobre rango (1-1/4 molaridad calculada para la VP7) de concentración efectiva para la inhibición de la infectividad viral. El hecho de que independientemente de la proporción monómero / tetrámero la solución de VP7-B-galactosidasa inhibe similarmente la infectividad es indicativo de que ambas poblaciones de estado de agregación participan en este fenómeno. La contribución fina de cada una de estas poblaciones deberá ser explorada en el momento de utilizar a esta proteína para caracterizar al probable receptor viral.

La coincubación de la proteína VP7-B-galactosidasa soluble con el rotavirus SA11, durante el periodo de adsorción, inhibe la infección del virus a células MA104. La interpretación más sencilla a esta observación es que la región de VP7 en la proteína de fusión interactúa con los receptores celulares del virus, impidiendo su adsorción y subsecuente penetración. Esto a su vez, sugeriría que la glicosilación, la cual está ausente en la VP7 bacteriana, no es necesaria para esta intracción. Lo anterior está de acuerdo con el hecho de que se ha logrado aislar mutantes de rotavirus cuya VP7 no está glicosilada y los cuales son igualmente capaces que los virus silvestres para infectar células en cultivo (74).

Otras posibilidades para explicar la inhibición de la infectividad del rotavirus SA11 por VP7-B-galactosidasa incluyen, la interacción de la porción de VP7 en la proteína híbrida con el SA11, y la interacción de la región de B-galactosidasa con el virus o con proteínas membranales celulares.

De acuerdo con la idea de que VP7-B-galactosidasa pudiera estar interactuando con los receptores del virus, está el hecho de que la concentración de proteína híbrida necesaria para causar

el 50% de disminución en la infectividad del SA11 *in vitro* (entre 10^{-9} y 10^{-7} M), está en el rango molar observado en otros sistemas virales para la competencia de péptidos o proteínas por la infectividad viral, así como experimentos de adsorción de éstos a la célula huésped (56,57,58).

La posibilidad de que la VP7-B-galactosidasa interactúe directamente con los receptores para el rotavirus SA11, ofrece la perspectiva de contar con un arma útil para abordar directamente el estudio de éstos receptores, caracterizando su afinidad por distintos serotipos de rotavirus, su expresión en otros tipos celulares, la regulación temporal de su expresión, su participación en el mecanismo propio de internalización viral, etc.

El poder contar con grandes cantidades de una proteína que inhibe la infección de rotavirus a través de una competencia por los receptores virales, ofrece la posibilidad de explorar la capacidad de ésta proteína híbrida para ser utilizada directamente como competidor de la infección por rotavirus *in vivo*, lo que dificultaría la propagación viral en el intestino delgado, facilitando así su eliminación por el huésped.

La VP7-B-galactosidasa es capaz de inducir anticuerpos neutralizantes contra SA11 en títulos comparables a los inducidos por la glicoproteína purificada directamente de la partícula viral (24,36,50).

Nuestros resultados indican que cuatro inoculaciones con la proteína híbrida VP7-B-galactosidasa en el rango de 7 a 30 ug (de la porción de VP7 en el híbrido) por inoculación inducen un título de anticuerpos neutralizantes de alrededor de 1/800. Este resultado es comparable con los de Sabara et.al. (36) quienes obtuvieron un título de 1/400 con tres inoculaciones de 5 ug de VP7 viral, purificada por un gel de acrilamida-SDS, o con tres inoculaciones de 14 ug de un fragmento de VP7. Bastardo et.al (50), a su vez, obtuvieron un título de 1/1600 con cuatro inoculaciones de 100 ug de VP7 de SA11, también purificada en un gel desnaturalizante de poliacrilamida.

Títulos mayores (1/10000), fueron obtenidos con la VP7 del rotavirus bovino NCDV (24). Esta diferencia probablemente se deba a que la proteína en este último experimento se obtuvo por isolectroenfoque en condiciones no desnaturalizantes.

En nuestro trabajo, el título de anticuerpos neutralizantes contra SA11 obtenido por inmunizaciones con el virus completo fue aproximadamente 20 veces mayor que el obtenido con dosis equivalentes de VP7 en la proteína híbrida. Esta diferencia puede deberse a diversos factores, entre los cuales están: la presencia en el virus completo de la otra proteína de capa

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

externa, VP3, la cual también induce anticuerpos neutralizantes (32,35,50), y el hecho de que las proteínas de capa externa al estar integradas en la partícula viral entera puedan ser más inmunogénicas.

Dentro de este contexto es importante mencionar que secuencias de la proteína VP3, sintetizada también en *Escherichia coli*, inducen anticuerpos neutralizantes en títulos que también son comparables (1/1200) a los obtenidos con la VP7-B-galactosidasa (22).

Una posibilidad interesante es el explorar la aditividad en la inducción de anticuerpos neutralizantes de estas dos proteínas virales sintetizadas en bacteria, así como su efecto conjunto para sensibilizar al sistema inmune.

La proteína híbrida es capaz de sensibilizar al sistema inmune sérico del ratón, presentándose una clara respuesta secundaria de producción de anticuerpos neutralizantes ante una posterior inmunización con SA11.

Los ratones que recibieron tres inoculaciones de la proteína híbrida (equivalentes a 30 ug de VP7 por inoculación), y posteriormente fueron inmunizados con el virus completo, respondieron ante éste de manera secundaria. Sin embargo, una sola dosis de la proteína híbrida fue suficiente para causar la evocación de una producción incrementada de anticuerpos neutralizantes, ante un posterior (21 días), contacto con SA11.

Estas observaciones sugieren la presencia en una forma inmunogénica de epítopes de neutralización compartidos entre la VP7 viral y la VP7 fusionada a B-galactosidasa (60).

Aunque la proteína no induzca per se altos títulos de anticuerpos neutralizantes, el hecho de que sea capaz de sensibilizar al sistema inmune (hecho que tendrá que ser confirmado en otros sistemas animales y por la vía oral), le da una gran relevancia para su posible utilización como inmunógeno protector contra la diarrea por rotavirus, ya que se ha observado que la sintomatología grave en las infecciones con éstos virus, se da en el primer contacto, mientras que las infecciones subsiguientes son asintomáticas o con sintomatología muy leve (19).

Los anticuerpos neutralizantes inducidos por la proteína híbrida son específicos de serotipo. Sin embargo, el hecho de que los anticuerpos neutralizantes en los sueros de animales inoculados con VP7-B-gal sean específicos de serotipo 3, no excluye la posibilidad de que ésta proteína pudiera sensibilizar a la respuesta inmune contra otros serotipos. Lo anterior se apoya en la posible formación de células de memoria T ayudadoras que pudieran estimular a células B presentadoras de algún

epitope viral distinto al que reconoce el anticuerpo que secreta (61). Este anticuerpo, al estar dirigido contra otro epitope viral, que a su vez puede ser neutralizante, favorecería la protección heterotípica.

Por otro lado, se ha descrito recientemente que existen epitopes, tanto en VP7 como en VP3, que son capaces de inducir anticuerpos que neutralizan a rotavirus pertenecientes a varios serotipos (33,53,62,64,69). En nuestro laboratorio hemos sintetizado en *E.coli* una región de la proteína VP3 del rotavirus SA11, que además de inducir anticuerpos que neutralizan a SA11 (serotipo 3), induce también anticuerpos que neutralizan (1/400) al rotavirus ST3 (serotipo 4) (22).

Los resultados obtenidos en este trabajo son alentadores para continuar explorando la capacidad de esta proteína híbrida de ser utilizada como inmunógeno contra la diarrea causada por rotavirus. Una de las posibilidades que resulta más atractiva es el empleo de bacterias entéricas atenuadas, como *Salmonella typhi* ó *Escherichia coli*, que pudieran servir de acarreadores de las proteínas virales al sistema inmune intestinal, el cual es necesario estimular para inducir protección contra la infección por rotavirus. Recientemente se ha reportado el empleo de cepas atenuadas de *Salmonella typhimurium* (72), como portadoras efectivas de la proteína NS del *Staphylococcus pyogenes* (63), la subunidad B de la toxina del cólera y la toxina LT de *E.coli* (73) hacia el sistema inmune humoral (sistémico y local) y celular.

El poder sintetizar en bacterias, a partir de un gene clonado, el principal antígeno de neutralización de los rotavirus, junto con la creciente información sobre epitopes relevantes de esta proteína, dada por el uso de péptidos sintéticos y anticuerpos monoclonales, son factores que podrían permitir, a través de la manipulación con técnicas de ingeniería genética, la optimización de la inducción de anticuerpos, tanto homotípicos como heterotípicos por esta proteína viral, para así ser utilizada como un inmunógeno efectivo contra la diarrea por rotavirus.

BIBLIOGRAFIA

1. Warren S.K. Great neglected diseases of the developing world and their possible control by vaccination. Vaccines 85. Cold Spring Harbor Laboratory 1985: 373-376
2. Gurwith, M., Wenman, W., Gurwith, D., Brunton, J., Feltham, S., Greenberg, H. Diarrhea among infants and young children in Canada: a longitudinal study in three Northern communities. The J. of Inf. Dis. vol.147 no.4 pp.685-692. (1983).
3. Las condiciones de salud en las Américas. Washington D.C. Organización Panamericana de la Salud, vol.5 No.4 1984.
4. Black, E.R., Greenberg, B.H., Kapikian, Z.A., Brown, H.K., Becker, S. Acquisition of serum antibody to Norwalk virus and rotavirus and relation to diarrhea in a longitudinal study of young children in rural Bangladesh. The J. of Inf. Dis. vol. 145 no.4; pp.483-488. (1982).
5. C. Soler, R. Espejo, J. Olarte. Gastrointestinal asymptomatic carriers. Sujeto a revisión para su publicación.
6. Cuckor, G., Blackglow, N. Human viral gastroenteritis. Micob. Rev. vol. 48; pp. 157-179. (1984).
7. Espejo, R., et al. Rotavirus gastroenteritis in hospitalized infants and young children in México City. Lat. Amer. Microbiol. vol. 20 ; pp.239-246. (1978).
8. Espejo R., et al. Presence of two distinct types of rotavirus in infants and young children hospitalized with acute gastroenteritis in México City, 1977. J. Infect. Dis. vol. 139; pp.474-477. (1979).
9. Holmes, I.H.: Rotaviruses, in Joklik, W.K. (Ed.), The Reoviridae. Plenum, New York, 1983, pp. 359-423.
10. Woode, G., et al. Studies on cross-protection in calves by rotaviruses of calves, children, and foals. Vet. Rec. vol. 103; pp.32. (1978)

11. Leece, J., et al. The calf reo-like virus vaccine: an ineffective immunization agent for rotaviral diarrhea of piglets. *Can. J. Comp. Med.* vol. 43; pp. 90. (1978).
12. Clark, H.F., Furukawa, T., Bell, L., Offit, P., Perrella, P., Plotkin, S. Immune response of infants and children to low-passage bovine rotavirus (strain WC3). *Am. J. Dis. Chil.* 140; pp. 350-356. (1986).
13. Bartlett, A.V., Bednarz-Prashad, A.J., DuPont, H.L., Pickering, L.K. Rotavirus Gastroenteritis. *Ann. Rev. Med.*; pp. 399-415 (1987). 13.
14. Flewett, T.H., Bryden, A.S., Davies, H. Diagnostic electron microscopy of faeces. I. The viral flora of the faeces as seen by electron microscopy. *J. Clin. Pathol.* 27; pp. 603. (1974).
15. Arias, C.F., López, S., Espejo, T.R. Gene Protein Products of SA11 Simian Rotavirus Genome. *J. of Vir.* vol. 47, no. 1; pp. 42-50. (1982).
16. Espejo, R.T., López, S. and Arias, C.F. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* 37; pp. 156-160. (1981).
17. Flewett, T.H., Woode, G.N. The rotaviruses. *Arch. Virol.* 57; pp. 1. (1978).
18. Kalica, A.L., et al. Genes of human and bovine rotaviruses that code for neutralization and subgroup antigens. *Virology.* vol. 112; pp. 385-390 (1981).
19. Kapikian, Z.A., Chanock, M.R. Rotaviruses. *Virology.* Raven Press, New York. 1985.
20. Cukor, G., Blacklow, R. Human Viral Gastroenteritis. *Microb. Rev.* vol. 48; p. 159. (1984).
21. Kalica, A.L. et al. Identification of the rotaviral gene that codes for hemagglutination and protease-enhanced plaque formation. *Virology.* vol. 125; pp. 194-205. (1983).
22. Arias, C.F., Lizano, M., Lopez, S. Synthesis in *Escherichia coli* and immunological characterization of a polypeptide containing the cleavage sites associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *J. Gen. Vir.* vol. 68 pp. 633-642. (1987).

23. Choppin, P. et al. The role of viral glycoprotein in adsorption, penetration and pathogenicity of viruses. *Rev. Infect. Dis.* vol. 2: pp. 40-61. (1978).
24. Matsuno, S., Inouye, S. Purification of an outer capsid glycoprotein of neonatal calf diarrhoea virus and preparation of its antisera. *Infect. Immun.* vol. 39: pp. 155-158, (1983).
25. Arias, C.F., Lopez, S., Bell, J.R., Strauss J.H. Primary structure of the neutralization antigen of simian rotavirus SA11 as deduced from cDNA sequence. *J. Virol.* vol. 50: pp. 657-661. (1984).
26. López, S., Arias, C.F., Bell, J.R., Strauss, J.H., Espejo, R.T. Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *Virology.* vol. 144: pp. 11-19. (1985).
27. Sabara, M., Gilchrist, J.E., Hudson, G.R., Babiuk, L.A. Preliminary characterization of an epitope involved in neutralization and cell attachment that is located in the major bovine rotavirus glycoprotein. *J. Virol.* vol. 53: pp. 58-66. (1985).
28. Laradins, T., Sonza, S., Dyal-Smith, M.L., Coulson, B.S., Holmes, J.H. Demonstration of an immunodominant site by analysis of antigenic variants of SA11 rotavirus. *J. Virol.* vol. 56: pp. 317-319. (1985).
29. Ericson, B.L., Graham, D.Y., Mason, B.B., Estes, M.K. Identification, synthesis and modification of simian rotavirus SA11 polypeptides in infected cells. *J. Virol.* vol. 42: pp. 825-839. (1982).
30. Germino, J., Gray, G.G., Charbonneau, H., Vanaman, T., Bastia, B. Use of gene fusions and protein-protein interaction in the isolation of a biologically active regulatory protein: the replication initiator protein of plasmid R6K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* vol. 80: pp. 6848-6852. (1983).
31. Arias, C.F., Ballado, T., Plebański, M. Synthesis of the outer-capsid glycoprotein of the simian rotavirus SA11 in *Escherichia coli*. *Gene.* vol. 47: pp. 211-219. (1986).
32. Greenberg, H.B. et al. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of Rhesus rotavirus. *J. Virol.* vol. 47: pp. 267-275. (1983).

33. Tamura, H., Uragawa, S., Uragawa, T. Preparation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies with different reactivity patterns to human rotaviruses. *J. Gen. Virol.* vol. 66: pp. 1045-1057. (1985).
34. Song, S., Breshkin, A.M., Holmes, I.H. The major surface protein of simian rotavirus SA11 contains distinct epitopes. *Virology* vol. 134: pp. 318-327. (1984).
35. Giffit, P.A., Shaw, R., Greenberg, H.B. Passive protection against rotavirus induced diarrhea by monoclonal antibodies to VP3 and VP7. *J. Virol.* vol. 58: pp. 700-707. (1984).
36. Sabara, M., Barrington, A., Babiol, J.A. Immunogenicity of a bovine rotavirus glycoprotein fragment. *J. Virol.* vol. 54: pp. 1037-1040. (1985).
37. Field, D.G., Yansuri, P., Small, B., Dowbenko, D., Moore, D.M., Grebas, N. L., McFadden, F. D., Morgan, D. O., Robertson, D. H., Barzuch, H. L.: Cloned viral protein vaccine for foot and mouth disease: response in cattle and swine. *Science* 214: pp. 1125-1129 (1981).
38. Loewy, G. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: pp. 265-275. (1951).
39. Miller, J. A.: Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.: pp. 352-355. (1972).
40. Arias, C. E., López, S., Espino, R.: Identification of the RNA segments encoding some structural polypeptides of Nebraska calf diarrhoea virus. *Rev. Lat. Am. Microbiol.* 24: pp. 47-54. (1982).
41. Lacandè, H. P. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London: 227: pp. 680-685. (1970).
42. Goldman, D., Sedman, S. A., Flier, N. H. *Science* 211: p. 1437. (1981).
43. Marchesi, S. L., Steers, E. Jr., Shifrin, S. Purification and characterization of the multiple forms of B-galactosidase of *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* 181: pp. 20-34. (1986).
44. Ishikawa, E., Kato, K. Ultrasensitive enzyme immunoassay. *Scand. J. Immunol. B* (Supl.): pp. 43 (1978).

45. Warren, H.S., Vogel, F.R., Chedid, L.A. Current status of immunological adjuvants. *Ann. Rev. Immunol.*; pp. 369-388. (1986).
46. Shaw, R.D., Stoner-Ma, D.L., Estes, M.K. and Greenberg, H.B. Specific enzyme-linked immunoassay for rotavirus serotypes 1 and 3. *J. Clin. Microbiol.* 22; pp. 286-291. (1984).
47. Leonard J. Kazmier. *Estadística Aplicada a la Administración y a la Economía*. Editorial McGraw-Hill. 1978.
48. Francis, M.J., Fry, C.M., Rowlands, D.J., Brown, F., Bittle, J.L., Houghten, R.A., Lerner, R.A. Immunological priming with synthetic peptides of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* vol. 66; pp 2347-2354. (1985).
49. Dyal-Smith, M.L., Lazdins, I., Tregear, G.W., Holmes, I.A. Localization of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* vol. 83; pp. 3465-3468. (1986).
50. Bastardo, J.W., McImm-Breshkin, J.L., Sonza, S., Mercer, L.D., Holmes, I.H. Preparation and purification of antisera to electrophoretically purified SA11 virus polypeptides. *Infect. & Imm.* vol. 34 No. 3; pp. 641-647. (1981).
51. Fosset, M., Chappelot-Tordo, D., Lazadunski, M. Intestinal alkaline phosphatase. Physical properties and quaternary structure. *Biochemistry* vol. 13 No. 9; pp. 1783-1788. (1974).
52. Kennedy, R.C., Dreesman, G.R. Enhancement of the immune response to hepatitis B surface antigen. *J. of Exp. Med.* vol. 159; pp. 655-665. (1984).
53. Kalica, R.A., Greenberg, B.H., Wyatt, G.R., Flores, J., Sereno, M.M., Kapikian, A.Z., Chanock, M.R. Genes of human (strain Wa) and bovine (strain UK) rotaviruses that code for neutralization and subgroup antigens. *Virology* vol. 112; pp. 385-390. (1981).
54. Vesikari, T., Isolauri, E., Delem, A., D'Hond, E., Andre, F., Zissis, G. Protection of infants against rotavirus diarrhoea by RIT4237 attenuated bovine rotavirus strain. *Lancet* 1; pp. 977-981. (1984).

55. Vesikiari, T., Kapikian, A.Z., Delem, A., Zissis, G. A comparative trial of rhesus monkey (RRV-1) and bovine (RIT 4237) rotavirus vaccines in young children. *J. Infect. Dis.* 153; pp.832-839. (1986).
56. Richardson, C.D., Choppin, P.W. Oligopeptides that specifically inhibit membrane fusion by paramyxoviruses: studies on the site of action. *Virology* 131:p. 528 (1983).
57. Deen, K., McDougal, J., Folena-Wasserman, G., Arthos, J., Rosenberg, J., Maddon, P., Axel, R., Sweet, R. A soluble form of CD4(T4) protein inhibits AIDS virus infection. *Nature* 331 ;pp. 82-84 (1988).
58. Fries, E., Helenius, A. Binding of Semliki forest virus and its spike glycoprotein to cells. *Eur. J. Biochem.* 97; pp.213-220 (1979).
59. Greene, M.I., Weiner, H.L. Delayed hypersensitivity in mice infected with reovirus. *J. Immunol.* 125 No.1 ; pp.283-287. (1980).
60. Benacerraf, B., Unanue, E.R. Textbook of Immunology. Williams and Wilkins Company. (1979).
61. Milich, D., McLachlan, A., Thornton, G., Hughes, J. Antibody production to the nucleocapsid and envelope of hepatitis B virus primed by a single synthetic T cell site. *Nature* 329; pp. 547-549 (1987).
62. Greenberg, H.B. Characterization of the rhesus rotavirus VP3 gene: Location of amino acids involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84; pp. 1-6 (1987).
63. Poirer, T.P., Kehue, M.A., Beachey, E.H. Mucosal and systemic immunity evoked by attenuated arO A Salmonella typhimurium expressing cloned streptococcal M protein. Manadado a publicación en Vaccines.
64. Benfield, D., Nelson, E., Hoshino, Y. A monoclonal antibody to the Gottfried strain of porcine rotavirus which neutralizes rotavirus serotypes 3, 4 and 6. VII International Congress of Virology. Canada (1987).
65. Hopp, T.P., Woods, K.R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl.*

66. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, D. The Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc.:pp. 335-355 (1983).
67. Rose, J.K., Shafferman, A. Conditional expression of the vesicular stomatitis virus glycoprotein gene in *E. coli*. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:pp. 6670-6674 (1981).
68. Taniguchi, K., Morita, Y., Urasawa, T., Urasawa, S. Cross-reactive neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus: analysis with monoclonal antibodies and antigenic variants. J.Virol. 61 No.5:pp.1726-1730 (1987).
69. Coulson, B.S., Tursi, J.M., Mc.Adam, W.J., Bishop, R.F. Derivation of neutralizing monoclonal antibodies to human rotaviruses and evidence that an immunodominant neutralization site is shared between serotypes 1 and 3.
70. Soler, C., Musalem, C., Loroño, M., Espejo, R. Association of viral proteins with membranes in SA11-infected cells. J.Virol. 44 No.3: pp.983-992 (1982).
71. DeMol, P., Zissis, G., Butzler, J.P., Mutwewingabo, A., Andre, F.E. Failure of live, attenuated oral rotavirus vaccine. The Lancet, July 12: p. 108 (1986).
72. Hoiseth, S.K., Stocker, A.D. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. Nature 291:pp.238-239 (1981).
73. Dougan, G., Hormachae, C.E., Maskell, D.J. Live oral *Salmonella* vaccines: potential use of attenuated strains as carriers of heterologous antigens to the immune system. Parasite Immunol. 9: pp.151-160 (1987).
74. Estes, M., Graham, D., Ramig, R., Ericson, B. Heterogeneity in the structural glycoprotein (VP7) of simian rotavirus SA11. Virol. 122: pp.8-14 (1982).
75. Fowler, A.V., Zabin, I. The amino acid sequence of B-galactosidase of *Escherichia coli*.